

Aus dem Biochemischen Laboratorium der Hals-
Nasen- Ohren-Klinik der Universität München

Direktor: Prof. Dr. H. H. Naumann

Isolierung der mit dem Inter- α -trypsininhibitor
korrelierenden säurestabilen Proteaseninhibito-
ren des menschlichen Serums.

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München



vorgelegt von

Otto Steiner

Traunstein

1976

Mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin
der Universität München

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Hochstraßer
2. Berichterstatter: Prof. Dr. H. H. Naumann
Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 6.8.1976



DISSERTATIONS— UND FOTODRUCK FRANK oHG
8 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2 8 0 9 0 9 0

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Einleitung	1
I. Theoretischer Teil	2
1. Proteasen	2
2. Inhibitoren	5
a) Entdeckung der Proteaseninhibitoren	5
b) chemische Eigenschaften von Proteasen- inhibitoren	6
c) Physiologische Eigenschaften von Pro- teaseninhibitoren	9
d) Pharmakologische Wirkungen von Pro- teaseninhibitoren	12
II. Problemstellung der Arbeit	14
III. Ergebnisteil	15
IV. Experimenteller Teil	22
1. Definitionen und Arbeitsmethoden	22
a) Definition der internationalen Inhibitoreinheit	22
b) Bestimmung der Inhibitoreinheit	22
c) Hemmkurve und Hemmspektren	23
d) Trypsinhemmtest	25
e) Chymotrypsinhemmtest	28
f) Wasserlösliche Enzymharze	30
g) Immunelektrophorese	32
2. Arbeitsgänge zur Isolierung der inhibatoren	35
a) Gewinnung einer ungereinigten Lösung	35
b) Reinigung der Inhibitoren über mehrere Schritte	36

	Seite
3. Charakterisierung der Inhibitoren	45
a) Hemmspektrum	45
b) Immunelektrophorese	45
c) Molekulargewichtsbestimmung	50
d) Endgruppenbestimmung	50
e) Aminosäurezusammensetzung	52
f) Aktives Zentrum	52
g) Spezifische Aktivität	53
V. Diskussion	54
VI. Zusammenfassung	57
Literaturverzeichnis	58

E i n l e i t u n g

Die Bedeutung von Enzyminhibitoren nimmt einen immer breiteren Raum in der gesamten medizinischen Forschung ein. In den letzten Jahren konnten hierbei besonders auf dem Gebiet der Proteaseninhibitoren beachtliche Fortschritte erzielt werden. Vor kurzem wurde auch das Vorkommen eines niedermolekularen Proteaseninhibitors im Nasen- und Bronchialsekret des Menschen festgestellt. Im Arbeitskreis Hochstraßer wurde mir die Aufgabe gestellt, einen im menschlichen Serum vorhandenen niedermolekularen Proteaseninhibitor zu isolieren und zwar zur genaueren Charakterisierung und zum Vergleich mit dem erwähnten Bronchialsekretinhibitor.

I. Theoretischer Teil:

Jeder im biologischen Sinne lebende Organismus - sei er nun pflanzlicher, tierischer oder menschlicher Natur - benötigt zur Aufrechterhaltung sowohl seiner thermodynamisch äußerst labilen Konstitution als auch zur Regulation seiner gesamten komplexen Funktionsabläufe sehr präzise arbeitende Kontrollmöglichkeiten. Spezifische, hochmolekulare Eiweißkörper, Enzyme genannt, ermöglichen die Funktionstätigkeit des Organismus durch begrenzte Proteolyse und gerichteten Umbau zugeführter Proteine in für den Organismus notwendige Substanzen und Energie. Auf diese Weise wird jeder einzelne Schritt im Stoffwechsel durch Enzyme katalysiert.

Die jeweils erforderliche Aktivität der Enzyme an einem bestimmten Ort kann durch verschiedene Mechanismen reguliert werden. Neben der Geschwindigkeit der Biosynthese durch Vermittlung der DNS in der Zelle, der Allosterischen Reaktion und einiger anderer Faktoren spielen vor allem auch vom Organismus selbst produzierte spezifische Hemmstoffe, sogenannte Inhibitoren, eine wesentliche Rolle bei der Kontrolle der Enzymaktivität.

1. Proteasen:

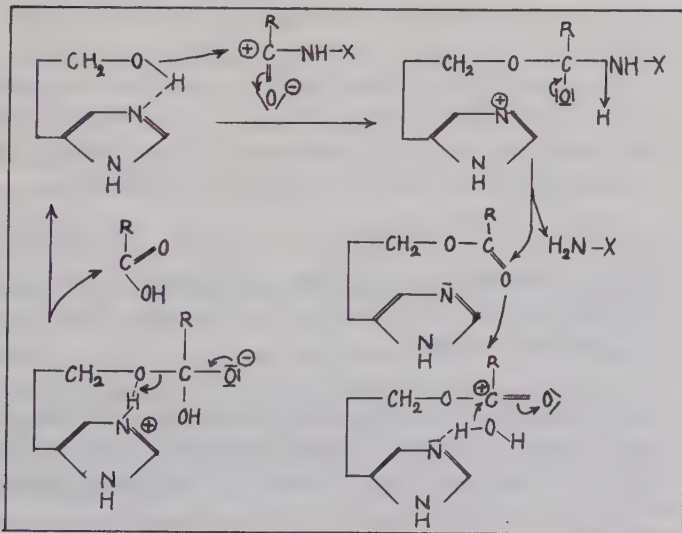
Definition: Proteasen sind Eiweißkörper, die die Spaltung eines Proteins oder von Peptiden in kleinere Bruchstücke oder Aminosäuren katalysieren. Solche hochmolekularen Biokatalysatoren bezeichnet man als Enzyme.

Bei diesem Vorgang wird durch Erniedrigung der Aktivierungsenergie durch Ladungs- und Konformationsänderung des Proteins die Reaktionsschwelle für die hydrolytische Spaltung der Peptidbindungen herabgesetzt und diese dadurch ermöglicht. Viele dieser Proteasen greifen nur an ganz bestimmten Peptidbindungen innerhalb der Peptidkette an wie z.B. Trypsin, Pepsin, Plasmin, Thrombin oder bevorzugen zumindest bestimmte Peptidbindungen und spalten diese schneller als andere wie z.B. Chymotrypsin. Der lebende Organismus kann nun mit Hilfe verschiedener Enzyme wie z.B. Proteasen, Esterasen, Lipasen etc. den Abbau und Umbau von ihm zugeführten Substanzen kontrollieren und lenken. Diese Enzyme liegen im Körper aber meist in inaktiven Vorstufen oder in durch Membranen abgegrenzten Gebilden wie z.B. Zymogengranula oder Lysosomen vor, um nicht körpereigene Proteine angreifen zu können. So wird z.B. inaktives Trypsinogen erst durch Enterokinase in der Darmwand in aktives Trypsin umgewandelt. Dabei kommt zugleich eine Änderung der Konformation zustande, die für die Aktivität des Enzyms von entscheidender Bedeutung ist. Als weiterer Befund läßt sich ein aktiver Bereich in jedem Enzym feststellen. Bei vielen findet sich Serin im aktiven Zentrum. Diese werden als Serin-Enzyme zusammengefaßt, z.B. Trypsin, Chymotrypsin, Thrombin, Plasmin.

Die verschiedene Substratspezifität von Proteasen mit identischem aktivem Zentrum wird durch die jeweils anders strukturierte Umgebung und die Tertiärstruktur der Enzyme erreicht. Trypsin spaltet z.B. nur Peptidbindungen bei denen die Carboxylgruppen der basischen AS Arginin und Lysin frei werden.

Chymotrypsin bevorzugt Peptidbindungen mit aromat. Aminosäuren, (spaltet aber auch alle anderen Peptidbindungen nur langsamer und ist daher für Regulationsmechanismen ungeeignet.) Auch Thrombin und Plasmin spalten sehr spezifisch, was ihre Reglerfunktion bei den Gerinnungen und Fibrinolysevorgängen erklärt. (1,S.6)

Bei der Auffindung und Lokalisierung der aktiven Zentren der Proteasen wurde die Umsetzung funktioneller Gruppen - d.h. von AS-Resten des aktiven Zentrums - mit Gruppenspezifischen Reagenzien mit Erfolg durchgeführt. So wurde die OH Gruppe des Serins durch Diisopropyl-Fluorophosphat oder p-Nitrophenylacetat im aktiven Zentrum von Trypsin acyliert und das Enzym dadurch inaktiviert.



2. Inhibitoren: (Hochstr. Habil. S. 33, 37) (1)

Man fand in den verschiedensten tierischen und pflanzlichen Geweben Eiweißstoffe, die die Aktivität der Proteasen verminderten, bzw. aufhoben - sog. Antienzyme. Diese Proteine bezeichnet man heute als Enzym-inhibitoren und es wurden außer Proteaseninhibitoren auch solche für Lipasen, Esterasen und Ribonucleasen isoliert.

a) Entdeckung der Proteinaseinhibitoren

Die ersten Untersuchungen über Proteinaseinhibitoren führte Weinland (2) 1903 durch. Er beobachtete die Widerstandsfähigkeit von Nematoden gegen Verdauungsenzyme im menschlichen Darm. Frey, Kraut und Werle entdeckten 1930 in verschiedenen Organen des Rindes einen unspezifischen Inhibitor, der Trypsin, Chymotrypsin und Kallikrein hemmt. (3) Er hat bisher als einziger Inhibitor therapeutische Anwendung gefunden und wird unter dem Namen Trasylol vor allem bei akuter Pankreatitis, beim Schock, bei Verbrennungen und bei Blutgerinnungsstörungen (Marx) angewendet.

Neben diesen unspezifischen Inhibitoren kommen nach Fritz, Trautschold und Werle im Pankreas aller Spezies spezifische Inhibitoren vor. Diese hemmen immer nur ein bestimmtes Enzym.

Als erster pflanzlicher Inhibitor wurde 1944 von Ham und Sandstedt (4) der Sojabohneninhibitor entdeckt, der dann von Kunitz isoliert und charakterisiert wurde. (5)

Neuerdings wurden in verschiedenen anderen Pflanzen wie Kartoffeln (6) und Getreide (7, 8) - z.B. Mais - Proteinaseinhibitoren nachgewiesen und näher charakterisiert.

Tierische Inhibitoren fand man u.a. in Ascariden (9, 10, 11), im Ovomuroid (12), in der Colostrummilch von Mensch, Rind und Schwein (12, 13, 14), im menschlichen Harn (15), im Humanserum (16, 17, 18, 19), Rinderpankreas (20), Rinderlunge (21), im Sperma des Menschen (22), sowie in Seeanemonen.

b) Chemische Eigenschaften von Proteinaseinhibitoren: (1)

Nach dem Molekulargewicht lassen sich 2 Gruppen von Inhibitoren unterscheiden:

Die niedermolekularen Inhibitoren besitzen ein Molekulargewicht zwischen 6 000 und 20 000, die hochmolekularen Inhibitoren ein Molekulargewicht zwischen 20 000 und 180 000, das α_2 -Makroglobulin von 850 000. Zur ersten Gruppe gehören die meisten tierischen und menschlichen Inhibitoren, zur zweiten pflanzliche Inhibitoren, wie z.B. die aus Sojabohnen und Mais.

Chemisch sind die Proteinaseinhibitoren Polypeptide, Glycoproteide oder Proteine. Viele sind hochmolekulare Eiweißkörper, z.B. α_1 -Antitrypsin mit einem Molekulargewicht um 6 000. Die Aminosäurezusammensetzung und die sonstigen Eigenschaften dieser Inhibitoren weisen gegenüber anderen Proteinen keine Besonderheiten auf. Die isoelektrischen Punkte dieser Substanzen können bei verschiedenen Werten der pH-Skala liegen.

Im Bezug auf die Stabilität der Proteinaseinhibitoren findet man, daß inhibitorhaltiges Lyophilisat bei Temperaturen zwischen 0° und -20° C etwa 1/2 Jahr aufbewahrt werden kann, ohne daß durch Umstrukturierung des Hemmzentrums Aktivität verloren geht. Im pH-Bereich von 3 - 7 sind die Inhibitoren am hitzestabilsten, in alkalischen Lösungen werden sie aber langsam irreversibel zerstört.

Zur Hemmkapazität eines Proteaseninhibitors läßt sich folgendes sagen:

Die Hemmung der Trypsinwirkung z.B. erfolgt durch die Reaktion von 1 Mol Trypsin mit 1 Mol Inhibitor unter Blockierung des aktiven Zentrums des Enzyms. Bei Kenntnis der Molgewichte der Inhibitoren und des Trypsins kann für jeden Inhibitor eine spezifische Hemmkapazität errechnet werden. Bei idealer Hemmung, d.h. wenn die Dissoziationskonstante des Enzym-Inhibitor-Komplexes hinreichend klein ist, gilt:

$$\text{Hemmkapaz.} = \frac{\text{Molg. Trypsin}}{\text{Molg. Inhibitor}}$$

Bei Vorliegen polymerer Inhibitoren, wie etwa bei dimeren Hemmstoffen, sind die Hemmkapazitäten zweimal so hoch wie die theoretisch berechneten Werte, weil diese Stoffe beim Vorgang der Inhibition in die Untereinheiten zerfallen und so die doppelte Anzahl von Enzymmolekülen hemmen.

Weiterhin läßt sich eine Klassifizierung von Trypsin-inhibitoren durch die selektive Reaktion an den Lysin - bzw. Argininresten der aktiven Zentren durch Maleinsäureanhydrid bzw. mit Butadion - 2,3 vornehmen. Diese

Inhibitoren sind durch Umsetzen mit den genannten Substanzen leicht voneinander zu unterscheiden.

Als "Temporäre Hemmung" wird die Eigenschaft der selectiven Pankreas-Trypsininhibitoren bezeichnet. Nach einer bestimmten Zeit werden diese Inhibitoren durch das Enzym, das sie hemmen, verdaut. Von Laskowski und Wu (23) wurde diese Inhibitor-Eigenschaft erstmals folgendermaßen beschrieben:

Ein rascher Abbau des Inhibitors (5 - 7 Std.) durch das Enzym ist nur erreichbar, wenn die Anzahl der Inhibitormoleküle im Reaktionsraum wesentlich ca. $1/3$ unter der Anzahl der Enzymmoleküle liegt. Schon bei geringem Inhibitorüberschuß dauert der Abbau unverhältnismäßig lange (24 - 48 Std.). Laskowski und Wu erklären dies mit einer hypothetischen Gleichung:



Sie nahmen an, daß erst im Trypsin-Inhibitor-Komplex ein freies Trypsinmolekül die Lysyl- und Arginylbindungen im Inhibitormolekül aufbrechen kann. Der Trypsin-Inhibitor-Komplex bildet sich aber in Sekunden-schnelle.

Wenn nun Trypsin nicht im Überschuß vorliegt, ist fast alles Enzym an den Inhibitor gebunden und fast kein freies Trypsinmolekül zur Inhibitorspaltung im Reaktionsraum vorhanden. Dadurch verläuft der Abbau sehr langsam.

c) Physiologische Eigenschaften von Inhibitoren: (24)

1. Pflanzliche Inhibitoren

Mansfield beschreibt ihre Bedeutung folgendermaßen: (25)

"Die pflanzlichen Inhibitoren spielen allgemein eine Rolle bei der Aufrechterhaltung der latenten Lebensform durch Hemmung der Autolyse. Leguminosen z.B. besitzen Proteinaseinhibitoren; sie leben in Symbiose mit Knöllchenbakterien und schützen sich vermutlich mit Hilfe ihrer Inhibitoren gegen eine Überwucherung dieser Bakterien.

In anderer Weise enthalten z.B. Erdnüsse Lipaseinhibitoren, die im Ruhezustand die Lipasen, die ebenfalls in der Erdnuß reichlich vorhanden sind, hemmen. Die Lipasen treten erst beim Wachstum der jungen Pflanze in Aktion, um das Fett, das eine große Energiereserve darstellt, nutzbar zu machen. (26)

2. Tierische und menschliche Inhibitoren

Allgemeine Aufgaben der Proteinaseinhibitoren sind der Schutz gegen äußere Einflüsse und die zeitliche Begrenzung proteolytischer Vorgänge. Proteinaseinhibitoren wurden gefunden beim Schweinebandwurm zum Schutz vor Verdauung durch den Wirtsorganismus (2), im Ovomucoid als Schutzmechanismus während der Befruchtung des Eies (12), in der Colostrummilch der Säugetiere; hierbei schützen die Inhibitoren die Immunkörper aus der Muttermilch vor dem tryptischen Abbau im Dünndarm, dadurch gelangen die Globuline unversehrt

in den kindlichen Körper (27), im Blutserum von Mensch und Tier.

Die Inhibitoren des Blutserums haben den Zweck, die pathologische Überaktivität proteolytischer Enzyme abzufangen. Bei vielen Krankheiten findet man einen erheblichen Anstieg des Seruminhibitorspiegels, z.B. nach Myocardinfarkt, nach chirurgischen Eingriffen (28), bei malignen Erkrankungen, bei schweren Infektionen, bei Nierentransplantationen. (29, 30, 31)

Interessant ist, daß die Inhibitorproduktion genetisch festgelegt ist. Bei recessiv vererblichem Fehlen des humoralen α_1 -Antitrypsins kommt es z.B. gehäuft zu Lungenemphysem (32, 33) wegen mangelhaftem Schutz vor der zerstörenden Wirkung proteolytischer Enzyme.

In Rinderorganen:

Wahrscheinlich besteht ein Zusammenhang zwischen der außergewöhnlichen Besiedlung des Pansen durch Mikroorganismen und der allgemeinen Verbreitung von Proteinaseinhibitoren in Rinderorganen. Die Auseinandersetzung mit diesen Mikroorganismen und ihren Stoffwechselprodukten macht die Anwesenheit von Inhibitoren in vielen Rinderorganen notwendig (34).

Im Pankreas von Tier und Mensch:

Die Sekretion von Trypsin im Pankreas erfolgt gleichzeitig und in konstanten Konzentrationsverhältnissen zur Sekretion des Trypsininhibitors. Einige Autoren nehmen an, daß die physiologische Bedeutung des Inhibitors im Verhindern einer Autolyse des Pankreasgewebes durch die hier produzierten proteolytischen Enzyme besteht (35, 36).

In Samenblasen und Sperma des Mannes:

Durch die hieraus isolierten Inhibitoren wird vermutlich der Schutz der Genitalschleimhaut sowie lebensfähiger Samenzellen und bereits befruchteter Eizellen vor der Wirkung der akrosomalen Proteasen der Spermien gewährleistet. (37)

In der Schleimhaut der Atemwege von Mensch und Säugetier:

Hierbei schützen die Inhibitoren die Schleimhaut gegen Proteasen von Bakterien und anderen Mikroorganismen (34) und vor Leukozytenproteasen. (67)

Sämtliche niedermolekularen Inhibitoren sind relativ unspezifisch, das heißt, daß sie nicht nur ein einziges Enzym wie z.B. nur Trypsin oder nur Chymotrypsin hemmen, sondern daß ein breites Spektrum der verschiedensten Proteasen von ein und demselben Inhibitor neutralisiert wird. Allerdings ist die Wirkung den verschiedenen Enzymen gegenüber nicht gleich stark.

Im menschlichen Serum fand man mehrere Proteaseinhibitoren in den Globulinfraktionen wie z.B.

α_1 -Antitrypsin, α_1 -Antichymotrypsin Inter $-\alpha$ -Trypsininhibitor, Antithrombin III, C_1 -Inaktivator, α_2 -Makroglobulin.

Diese Inhibitoren unterscheiden sich in ihrem Molekulargewicht, chemischem Aufbau, ihrer Konzentration im Serum und in ihrem Hemmspektrum sehr deutlich voneinander. Von Bedeutung ist auch noch der Unterschied im Aufbau des "aktiven Zentrums", wobei α_1 -Antitrypsin und Antithrombin III zum Lysintyp und α_2 -Makroglobulin und Inter $-\alpha$ -Trypsininhibitor zum Arginintyp gehören (38, S. 16).

d) Pharmakologische Wirkungen von Proteinaseinhibitoren:

Von den bisher isolierten Proteinaseinhibitoren wurde vor allem der unspezifische Trypsininhibitor eingehend auf seine pharmakologischen Eigenschaften hin untersucht, da er sich aufgrund seines Hemmverhaltens im Gegensatz zu den spezifischen Inhibitoren zur Therapie zahlreicher Erkrankungen eignet.

1. Proteinaseinhibitoren in der Schocktherapie:

Im Schock ist die Kininogenkonzentration im Blut durch Einwirkung von Kininogenase vermindert (39, 40, 41). Die Kininogenase kann durch den unspezifischen Inhibitor aus Rinderorganen gehemmt werden. Bei toxischem Schock wird deshalb Rinderinhibitor verabreicht. (42)

2. Proteinaseinhibitor in der Therapie von Blutgerinnungsstörungen:

Bei primärer Hypofibrinogenämie: Der Inhibitor verbessert die Blutstillung (43).

Bei sekundärer Hypofibrinogenämie: Die Fibrinolyse wird durch Inhibitor aus Rinderorganen gehemmt (44, 45).

3. Proteinaseinhibitoren in der Pankreatitistherapie:

Zur Verhinderung einer frühzeitigen Aktivierung von Trypsinogen im Pankreas wird Rinderinhibitor gegeben (46, 47, 48). Er ist unter dem Namen Trasylol^R im Handel. Einige Untersucher vertreten eine bestimmte Hypothese über die Wirkung von Trasylol bei Pankreatitis:

Durch die primären entzündlichen Vorgänge im Pankreas wird das Kininsystem zu verstärkter Produktion angeregt (49), dies führt zu Blutdruckkrisen, die rückwirkend den Krankheitsablauf verschlimmern. Der Rinder-Trypsinkallikreininhibitor hemmt alle Enzyme des Kininsystems und verhindert somit die bei einer Pankreatitis häufigen Kreislaufzusammenbrüche (50, 51). Zur Therapie mit Proteinaseinhibitoren wird fast ausschließlich Trasylol verwendet, es wird i.v. als Dauertropfinfusion appliziert, hat eine Halbwertszeit von 15 Minuten und ist nach 6 Tagen vollständig über die Nieren ausgeschieden.

4. Neues Therapieprinzip bei Bronchitis durch Applikation von niedermolekularem Nasensekretinhibitor gegen Bakterien- und Leukozytenproteasen ist zu erwarten (52, 53).

II. Problemstellung der Arbeit

Untersuchungen von Hochstraßer und Mitarbeitern erbrachten den Nachweis von Proteinaseinhibitoren in der Schleimhaut des menschlichen Respirationstraktes.

Die hier gefundenen Inhibitoren haben die Aufgabe, das Flimmerepithel von Nase und Bronchien gegen die proteolytische Aktivität von Bakterien zu schützen und eine Eigenverdauung des Epithels durch Leukozytenproteasen zu verhindern. Aus den Sekreten der oberen Luftwege konnten 2 Proteinaseinhibitoren isoliert werden (54, 55, 56, 57, 58), die sich im Molgewicht unterscheiden und von denen der Überwiegende ein Molgewicht von 13 000 aufweist. Beide zeigen eine Antigenverwandtschaft mit dem Inter- α -trypsininhibitor. Über die Biogenese der Inhibitoren der oberen Luftwege, die für die Pathophysiologie dieses Bereiches von Interesse sind, können bisher nur Vermutungen angestellt werden. Es ergibt sich nämlich die Frage, ob diese Inhibitoren ein spezifisches Produkt der Schleimhäute darstellen, oder ob sie durch eine spezifische Leistung der Schleimhäute selektiv aus dem Blutserum sezerniert werden. Dabei bleibt weiterhin offen, ob sie etwa aus dem Inter- α -trypsininhibitor direkt entstehen, oder ob nur bereits im Plasma vorhandene Derivate des Inter- α -trypsininhibitors sezerniert werden.

Zur schrittweisen Klärung dieser Fragen erschien es notwendig, die säurestabilen niedermolekularen Inhibitoren des Serums zu isolieren und zu prüfen, ob und wieweit Beziehungen zwischen dem Inter- α -trypsininhibitor, den niedermolekularen Inhibitoren des Serums und den Bronchialsekretinhibitoren bestehen.

III. Ergebnisteil

1. Bei Messung der inhibitorischen Aktivität nach Enteiweißung von Serum mit Perchlorsäure ist nur noch freier, nicht an Protein gebundener, niedermolekularer Inhibitor vorhanden, da die höhermolekularen Plasmaproteine gefällt und auch das Inter- α -antitrypsin zerstört wurde.

Zur Isolierung der in sehr geringer Menge im enteiweißten Plasmaüberstand vorhandenen Inhibitoren ist die selektive reversible Bindung an wasserlösliche Trypsinzellulose die Methode der Wahl. Die Überstände wurden nach Neutralisation weitgehend im Rotationsverdampfer eingeengt und durch Druckdialyse partiell entsalzt. Bei einem Inhibitorgehalt von etwa 60 mIU/ml im Konzentrat wurde soviel Trypsinzellulose zugesetzt, bis im Trypsinhemmtest die gesamte Hemmwirkung innerhalb von etwa 10 Minuten aus der Lösung verschwunden war. Nach Auswaschen der verunreinigten Trypsinzellulose mit eisgekühltem Triäthanolamin-HCl-Puffer konnte die Hemmaktivität durch Senkung des pH-Wertes auf 2,0 zu 70 % wieder desorbiert und von der Trypsinzellulose separiert werden. Nach Neutralisation und Einengung in der Druckdialysekammer wurde das so gewonnene Material direkt der Gelfiltration unterworfen. Über eine Säule mit Sephadex G-75 erhielten wir durch einen Fraktomaten Fraktionen von 9 ml. Sämtliche Fraktionen wurden mit dem Trypsinhemmtest auf ihren Inhibitorgehalt überprüft. Aus dem ursprünglichen Material erhielten wir zwei deutlich voneinander getrennte Peaks mit inhibitorischer Aktivität. Die dem jeweiligen Peak zugeordneten Fraktionen wurden vereinigt. Für den ersten

Inhibitor ergab sich ein Molgewicht von 44 000, für den zweiten eines von 22 000. Außerdem wurden im Ausgangsmaterial noch enthaltene hoch- und niedermolekulare Verunreinigungen abgetrennt, wie aus dem automatisch im Uvicord bei 280 nm registrierten Proteingehalt der einzelnen Fraktionen ersichtlich ist. (siehe Abb. 1)

Um auszuschließen, daß die gefundenen Inhibitoren durch Säurebehandlung eventuell aus höhermolekularen Seruminhibitoren entstehen könnten, wurde die Trypsinzellulose mit nativem Plasma direkt inkubiert. Nach Auswaschen der Proteine und Desorption von Trypsinzellulose nach dem selben Verfahren wie vorher, konnte ebenfalls antiproteolytische Aktivität gewonnen werden, die in gleicher Weise durch Gelfiltration in zwei Komponenten auftrennbar war. Die Elutionsvolumina und somit auch die Molekulargewichte der beiden gefundenen Inhibitoren mit 44 000 und 22 000 waren die gleichen wie bei den Hemmstoffen aus dem Enteiweißungsüberstand, so daß wir schließlich vier verschiedene Inhibitorfraktionen und zwar je zwei zu 22 000 und je zwei zu 44 000 Molgewicht erhielten.

2. Nach der Reinigung durch Austauschchromatographie über eine Glassäule mit DEAE-Zellulose (siehe Abb. 2) erhielten wir bei allen vier Inhibitoren sehr ähnliche spezifische Aktivitäten von etwa 1000mIU/mg Protein. Die Hemmaktivität wurde wieder im Trypsinhemmtest gemessen. Der Proteingehalt der eingesetzten Inhibitorlösung wurde nach der Biuretmethode bestimmt.

Nimmt man eine stöchiometrische Reaktion zwischen

2 Molekülen Trypsin und 1 Molekül Inhibitor an, so müßte sich für die beiden höhermolekularen Inhibitoren nach der Berechnung

$$\frac{\text{Molgewicht Trypsin}}{\text{Molgewicht Inhibitor}} \times 1000$$

eine spezifische Aktivität von jeweils 550 mIU/mg ergeben, für die beiden niedermolekularen Inhibitoren je eine von 1090 mIU/mg Protein.

Die praktisch gefundenen Werte der niedermolekularen Inhibitoren stimmen mit den theoretisch ermittelten im Bereich der Fehlerbreite überein, die Werte der höhermolekularen Inhibitoren betragen jedoch annähernd das doppelte der theoretisch ermittelten und sprechen dafür, daß bei der Reaktion mit Trypsin ein Zerfall in 2 Untereinheiten erfolgt, die jeweils ein Mol Trypsin hemmen. Zusammenstellung der Ergebnisse siehe Tab. 1.

Tabelle 1

Aktivitätsausbeute aus jeweils 5 l Plasma nach der Elution von Trypsinzellulose und Trennung über Sephadex G-75. Spezifische Aktivitäten nach Reinigung an DEAE-Zellulose.

Herkunft des Inhibitors (Mol-Gewicht)	Hemmakti- vität (mIU)	spezif. Aktivität (mIU/mg) gefunden	theoretisch
aus Enteiweißungs- überstand (44 000)	6540	905	550
aus Nativplasma (44 000)	7240	885	550
aus Enteiweißungs- überstand (22 000)	5460	1050	1090
aus Nativplasma (22 000)	5800	1120	1090

3. Die Hemmkurven, die für jeden der 4 Inhibitoren sowohl gegen Trypsin als auch gegen Chymotrypsin ermittelt wurden, sind nahezu identisch. (Siehe Abb. 5, 6). Nach Definition entspricht $1\mu\text{g}$ Trypsin 1 mU Enzym. Im Titrationsansatz werden jeweils $10\mu\text{g}$ Trypsin entsprechend 10 mU eingesetzt. Das Molgewicht der beiden niedermolekularen Inhibitoren mit 22 000 entspricht etwa dem des Trypsins. Bei stöchiometrischer Reaktion müßte sich bei gleicher Einsatzmenge von Trypsin und Inhibitor eine 100 %-ige Hem-

mung ergeben. Dies wäre bei den niedermolekularen Inhibitoren bei einem Einsatz von $10\mu\text{g}$ und bei den höhermolekularen Inhibitoren mit dem Molgewicht von 44 000 bei $20\mu\text{g}$ Inhibitor erreicht. Mit Trypsin ergibt sich jedoch für alle 4 Inhibitoren bei je $10\mu\text{g}$ Einsatz eine Hemmung von etwa 80 %. Daraus ist ersichtlich, daß beide höhermolekularen Inhibitoren dimerisieren. Linear verläuft die Kurve bis zu einer Hemmung von etwa 50 %, flacht sich dann jedoch ab, so daß auch bei 100 % Inhibitorüberschuß - nämlich bei Einsatz von $20\mu\text{g}$ - $10\mu\text{g}$ Trypsin nur bis zu etwa 90 % gehemmt wird.

Bei den Chymotrypsinhemmkurven ergibt sich bei gleichem Einsatz von Enzym und Inhibitor eine Hemmwirkung von etwa 70 % für jeden der 4 Inhibitoren. Auch hierbei läßt sich keine 100 %-ige Hemmung erreichen. Linear verläuft die Kurve bis zu einer Hemmung von etwa 40 %.

4. Weiterhin ergab die Acylierung aller 4 Inhibitoren keine Verminderung der Inhibitoraktivität. Es handelt sich daher um Arginininhibitoren, d.h. diese Inhibitoren besitzen einen Argininrest am aktiven Zentrum wie die Hemmstoffe der Sekrete der oberen Luftwege (55, 56) und der Inter- α -trypsininhibitor. (38, S. 17).
5. Als nächster Schritt wurden zur Identifizierung der N-terminalen Aminosäure die Inhibitoren mit Dinitrophenylfluorbenzol behandelt. Nach saurer Hydrolyse der dinitrophenylierten Produkte ergab sich in allen Fällen nur ein einziges Dinitrophenylderivat unbekannter Zusammensetzung. Dies spricht für einen hohen

Reinheitsgrad der isolierten Substanzen. Die R_f -Werte dieses unbekannten Derivates liegen höher als die der Binitrophenylderivate von Tyrosin und Lysin, die in den bekannten Laufmitteln der Dünnschichtchromatographie am schnellsten wandern (siehe Abb. 8, Tab. 2)

6. Die Immunelektrophorese zeigt, daß alle 4 Inhibitoren mit monovalentem Antiserum gegen den Inter- α -trypsininhibitor Präcipitate bilden. Zur Gewinnung von monovalentem Antiserum, das wir von den Beringwerken Marburg erhielten, wurde Kaninchen hochgereinigter Inter- α -trypsininhibitor injiziert.

Die Lage der erhaltenen Präzipitate ist jedoch gegen die der Präzipitate mit dem Inter- α -trypsininhibitor, den wir zum Vergleich mitlaufen ließen, deutlich verschoben. (siehe Abb. 7) Die Bilder der 4 getesteten Inhibitoren sehen gleich aus. Die isolierten Inhibitoren besitzen eine andere Beweglichkeit als der Inter- α -trypsininhibitor. Mit polyvalentem Antiserum, das herstellungsbedingt keine Antikörper gegen den Inter- α -trypsininhibitor enthält, werden keine Präzipitate beobachtet.

7. Bei allen 4 isolierten Inhibitoren ergab sich eine im Beckman-Aminosäureautoanalyser ermittelte und in Tab. 2 aufgeführte prozentual ähnliche Aminosäurezusammensetzung. Auch aus diesem Ergebnis läßt sich folgern, daß der höhermolekulare Inhibitor ein Dimeres des niedermolekularen darstellt.

Tabelle 2:

Aminosäurezusammensetzung der säurestabilen Proteaseninhibitoren aus Humanplasma, berechnet aus der 24-, 48-, 72-h-Hydrolyse.

Aminosäure	Inhibitor (Mol.-Gew. 44000)		Inhibitor (Mol.-Gew. 22000)	
	aus Entei- weißungs- überstand	aus Nativ- plasma	aus Entei- weißungs- überstand	aus Nativ- plasma
	(%)	(%)	(%)	(%)
Asparaginsäure	10,1	9,0	10,0	9,9
Threonin	4,8	4,6	4,7	4,5
Serin	3,2	3,7	3,5	5,2
Glutaminsäure	12,3	11,0	14,7	12,7
Prolin	6,8	7,5	6,8	9,0
Glycin	6,8	7,3	4,5	6,3
Alanin	4,0	5,4	4,4	4,2
Cystin/2	11,8	11,4	13,8	10,3
Valin	5,8	5,3	4,5	3,4
Methionin	1,3	0,4	1,3	0,5
Isoleucin	2,0	2,2	1,7	2,4
Leucin	6,6	6,2	9,5	7,2
Tyrosin	5,6	4,6	3,8	4,7
Phenylalanin	6,3	6,2	5,1	5,8
Lysin	6,8	5,5	5,8	6,0
Histidin	-	-	-	-
Arginin	4,0	5,1	3,9	4,2
Glucosamin	1,8	4,6	2,0	3,7
N-terminale Aminosäure ⁺	1,24 ⁺⁺	1,24 ⁺⁺	1,24 ⁺⁺	1,24 ⁺⁺

⁺ Die N-terminale Aminosäure konnte nicht identifiziert werden.

⁺⁺ Relative R_f -Werte in Chloroform/Benzylalkohol/Essigsäure 7:3:0,3 auf Dünnschichtplatten (R_f -Wert von Bidinitrophenyllysin = 1).

IV. Experimenteller Teil

1. Definitionen und Arbeitsmethoden

a) Definition der internationalen Inhibitoreinheit

Die Definition der "Internationalen Inhibitoreinheit" ist eine Ableitung der Definition der "Internationalen Enzymeinheit".

Nach dem "Report of Enzyme Commission" (59) ist eine Enzymeinheit diejenige Menge eines Enzyms, die unter Standardbedingungen ein μMol Substrat/Min. katalysiert. Demnach ist eine Inhibitoreinheit die Menge Inhibitor, die 1 μg Enzym vollständig hemmt. Bei vielen Inhibitoren ist jedoch eine proportionale Hemmung des Enzyms durch den Inhibitor nur bis zu einem bestimmten Konzentrationsverhältnis der beiden Antagonisten zu beobachten. Trotz Zusatz einer größeren Menge von Inhibitor ergibt sich eine im Verhältnis geringere Hemmwirkung. Um definierbare Meßergebnisse zu erhalten, wird deshalb nach Trautschold (60) die Inhibitoreinheit folgendermaßen definiert:

Eine Inhibitoreinheit hemmt zwei Enzymeinheiten zu 50 %, d.h. reduziert den Substratumsatz um ein $\mu\text{Mol/Min.}$ Im Bereich der 50 %-Hemmung sind die Ergebnisse am genauesten.

b) Bestimmung der Inhibitormenge:

Die in einer Lösung enthaltene und unbekannte Inhibitormenge wird dadurch bestimmt, daß man einer festgelegten

Enzymmenge (z.B. Trypsin, Chymotrypsin) gerade so viel Inhibitor zufügt, daß man eine 50 % Hemmung erreicht und somit noch ein 50 % Enzymüberschuß vorhanden ist. Das noch freie Enzym spaltet ein zugegebenes Substrat. Die damit verbundene Extinctionsänderung ΔE wird bei einer festgelegten Wellenlänge im Photometer gemessen und zu einem nicht inhibitorhaltigen Vergleichswert in Relation gesetzt. Die Inhibitormenge läßt sich aus den eingesetzten Mengen der Reaktionspartner und der Extinctionsänderung ΔE im Verhältnis zum Vergleichswert ohne Schwierigkeit bestimmen.

c) Hemmkurve und Hemmspektren:

Zur Gewinnung einer Hemmkurve setzen wir einer konstanten Enzymmenge steigende Inhibitormengen zu. Es wird die verbleibende Aktivität des Enzyms nach unterschiedlicher Inhibitor-Zugabe gemessen und in einem Koordinatensystem aufgetragen.

Beispiel einer realen und idealen Hemmkurve

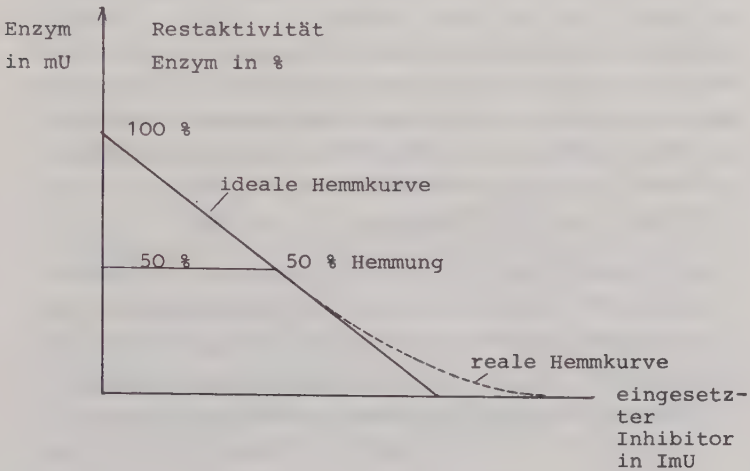


Abb. Ideale und reale Hemmkurve
Zu einer konstanten Enzymmenge werden steigende Mengen Inhibitor gegeben und die Restaktivität des Enzyms bestimmt.

Eine ideale Hemmkurve entstünde, wenn sich in jedem Konzentrationsverhältnis von Enzym zu Inhibitor eine Proportionalität zwischen eingesetzter Inhibitormenge und ihrer Wirkung ergeben würde. Diese hypothetische Forderung trifft aber nicht zu.

Deshalb ist der im unteren Teil abgeflachte Verlauf der Hemmkurve die Regel. Er zeigt einen im Verhältnis zur Hemmwirkung überproportionalen Inhibitoreinsatz an.

Um einen Inhibitor klar charakterisieren zu können, ist es notwendig, eine Reihe von Hemmkurven anzufertigen. Man erhält sie durch Austestung eines Inhibitors gegenüber verschiedenen standardisierten Enzymlösungen, z.B. von Trypsin, Chymotrypsin und Plasmin. Durch Zusammenfassung all dieser Ergebnisse ergibt sich ein für jeden Inhibitor charakteristisches Hemmspektrum. In diesem kommt zum Ausdruck daß:

- ein Inhibitor nur bestimmte Enzyme hemmt,
- verschiedene Inhibitoren in verschiedener charakteristischer Konzentration eingesetzt werden müssen, um die gleiche Hemmwirkung bei einem Enzym zu erreichen.
- nicht jeder Inhibitor bei einem Enzym in starkem Überschuß eine absolute Hemmung erreichen kann.

d) Trypsinhemmttest: (24, S. 5 - 6)

Der Trypsinhemmttest wird als Suchtest zum Nachweis eines in einem Gewebe bzw. Sekret vorkommenden Inhibitors angewendet, da praktisch alle der bisher bekannten Proteinaseinhibitoren die Eigenschaft der Trypsinhemmung besitzen. Ergibt sich ebenfalls eine Hemmung für Chymotrypsin, so enthält ein Gewebe oder eine Flüssigkeit einen unspezifischen Inhibitor.

Die Inhibitoreinheiten sind IU bzw. mIU = Millieinheit.

Prinzip:

Aus N-a-Benzoyl-Arginin - p - Nitroanilid (BAPNA) wird hydrolytisch Paranitroanilin freigesetzt. Diese Hydrolyse wird durch Trypsin katalysiert. Die hydrolytische Wirksamkeit des Trypsins ist durch die Farbstoff-

eigenschaften des entstehenden p-Nitroanilin durch Extinktionszunahme im Photometer bei 405 nm meßbar.

Für konstante Mengen eingesetzten Trypsins und Substrates erhält man im Photometer eine konstante Extinctionsänderung in der Zeiteinheit. In Anwesenheit von Inhibitor ist die Extinctionsänderung geringer. Die Verminderung der Extinctionsänderung ist dem Inhibitorgehalt des Ansatzes bis zu einem bestimmten Konzentrationsverhältnis von Enzym zu Inhibitor proportional.

R e a g e n z i e n:

0,2 m Triäthanolaminpuffer pH 7,8, 100 mg BAPNA in 100 ml aqua dest., 5 mg Trypsin in 100 ml 10^{-3} n HCl; Inhibitorhaltige Lösung. Trypsin E C 3.4.4.4 vom Rind mit TPCK behandelt stammte von der Fa. Merck.

M e ß v e r f a h r e n:

Zur Messung benutzten wir einen Eppendorf Photometer, der mit Licht der Wellenlänge 405 nm arbeitet. Die 3-ml-Glasküvetten des Photometers haben eine Schichtdicke von 1 cm.

Bestimmung des Leerwertes:

0,2 ml Trypsinlösung

1,8 ml Triäthanolaminpuffer

Eine Minute Inkubation bei einer Temperatur von 25° C
Zugabe von 1,0 ml BAPNA

Die Extinctionsänderung nach jeder Minute wird über 3 Minuten am Photometer abgelesen.

Zur Feststellung des Inhibitorgehaltes einer Lösung wird folgender Ansatz pipettiert:

0,2 ml Trypsinlösung

0,1 - 1,8 ml Testlösung
 Triäthanolaminpuffer ad 2 ml
 Eine Minute inkubieren bei 25° C
 Zugabe von 1,0 ml BAPNA.

B e r e c h n u n g e n :

Aus Leerwert, Testwert, Menge des eingesetzten Trypsins und der eingesetzten Testlösung kann der Inhibitorgehalt der Testlösung berechnet werden. Dabei wird zweckmäßigerweise die Inhibitormilliunit (mIU) an Stelle der Inhibitor-unit (IU) benutzt.

Eine Inhibitoreinheit (= IU) hemmt 1 µg Trypsin.

$$\text{mIU/ml} = \frac{(a-b) \cdot c \cdot d}{a}$$

a = Extinctionsänderung nur mit Trypsin (Leerwert) = 33

b = Extinctionsänderung des Testwertes (mit Trypsin und Inhibitor)

c = eingesetzte Trypsinmenge in gamma-(0,02 ml = 10 γ)

d = Umrechnungsfactor der Menge eingesetzter Testlösung auf einen Milliliter

Laut Definition gilt:

Unter Standardbedingungen setzt eine Enzymeinheit

1 µmol Substrat/Minute um. Das Substrat ist BAPNA.

Durch Enzymwirkung freigesetzter Farbstoff ist p-Nitroanilin.

Bei einem molaren Extinktionskoeffizienten des p-Nitroanilins von $9,95 \cdot 10^3 \frac{1}{\text{Mol} \times \text{cm}}$ entspricht eine Enzymeinheit (= EU) einer Extinctionsänderung von 9,95 pro Minute und Milliliter.

Für den auf 3 ml verdünnten Substratansatz ergibt sich für eine eingesetzte Enzymmilliunit (= mEU) eine Extinctionsänderung von 0,00332 pro Minute. Durch ein μg des verwendeten Trypsins wird eine Extinctionsänderung von 0,003 - 0,0035/Min. hervorgerufen. 1 μg Trypsin entspricht also 1 mEU.

Meßgenauigkeit:

Die Meßergebnisse werden auch durch die Anwesenheit großer Mengen Fremdeiweiß nicht beeinflusst. Die eingesetzte Menge Trypsin kann zwischen 1 μg und 20 μg schwanken, ohne daß die Empfindlichkeit des Testes wesentlich beeinflusst würde.

d) Chymotrypsinhemmtest (24, S. 7)

Prinzip

Aus Succinyl - phenylalanin - p-nitroanilid (SUPHEPA) wird durch Chymotrypsin enzymatisch der gelbe Farbstoff p - Nitroanilin freigesetzt. Die Extinctionszunahme wird bei 405 nm direkt photometrisch verfolgt. Sie ist ein Maß für die zugegebene Menge Chymotrypsin.

R e a g e n z i e n:

50 mg Succinyl - phenylalanin -p- nitroanilid

SUPHEPA in 10 ml Puffer

Chymotrypsin (EC 3.4.4.5.) vom Rind mit TLCK

(= Chlor- N - p - toluolosulfonyl - L -lysyl methan)

behandelt, stammt von der Fa. Merck.

1 mg Chymotrypsin in 10 ml 10^{-3} n- HCl; Inhibitor-

haltige Testlösung 0,2 m Triäthanolamin-Puffer pH 7,8

Meßverfahren:

In einer 3 ml Glaskuvette mit 1 cm Schichtdicke werden folgende Ansätze pipettiert:

- Leerwert: - 2 ml Triäthanolaminpuffer
- 1 ml SUPHEPA

Ungehemmte Enzymreaktion:

- 0,05 - 0,4 ml (= 5 - 40 μ g) Chymotrypsinlösung
- Auffüllen mit Triäthanolaminpuffer ad 2 ml
- Starten der Reaktion nach einminütiger Inkubation durch Zugabe von 1 ml Substrat.

Durch Inhibitor gehemmte Enzymreaktion:

- 0,05 - 0,4 ml Chymotrypsinlösung
- geeignete Menge inhibitorhaltiger Lösung
- Auffüllen ad 2 ml mit Triäthanolaminpuffer
- Starten der Reaktion nach einminütiger Inkubation durch Zugabe von 1 ml Substrat.

Sofort danach und alle halbe Stunde über 3 Stunden wird die Extinctionsänderung am Photometer abgelesen. Auch hier gilt: Eine Enzymmilliunit (= mEU) bewirkt eine Extinctionsänderung von 0,00332/Minute. 1 μ g Chymotrypsin erzeugt durch Substrat-hydrolyse aber nur eine Extinctionsänderung von 0,00015 - 0,00018/Minute im 3 ml Ansatz.

1 mEU entspricht also etwa 20 μ g Chymotrypsin.

Spezifität und Empfindlichkeit:

Der Test ist spezifisch für Chymotrypsin. Trypsin und andere Proteasen spalten das Substrat nicht. Die Empfindlichkeit des Testes liegt bei 5 μ g Chymotrypsin im 3 ml Ansatz. Die Meßergebnisse werden durch An-

wesenheit von Fremdeiweiß nicht wesentlich beeinflußt.

f) Wasserunlösliche Enzymharze:

Zur Reindarstellung und Anreicherung der von uns gesuchten Inhibitoren im menschlichen Plasma wählten wir ein Isolierungsverfahren mit wasserunlöslichen Enzymharzen (24, S. 16; 1, S. 50, 83).

Von Katchalski (61) wurde ein besonders geeignetes Trägerharz beschrieben, auf dem Trypsin ohne Verlust seiner proteolytischen Aktivität fixiert ist. Dabei bleibt die Fähigkeit des kovalent gebundenen Trypsins erhalten, mit Inhibitoren reversibel einen Enzyminhibitor-komplex zu bilden, dessen Gleichgewicht allein von der H^+ -Ionenkonzentration abhängt.

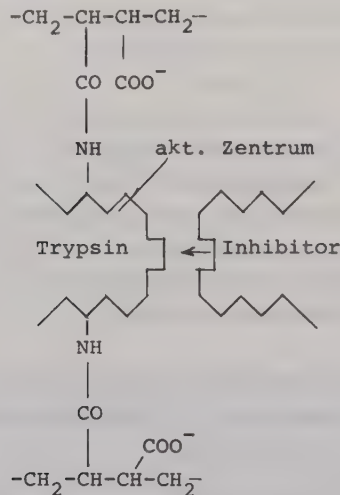
Bei pH 2,0 liegt etwa ein Prozentsatz von 20 % als Komplex vor, bei einem pH von 7,8 dagegen einer von über 90 %.

Der große Vorteil der wasserunlöslichen Proteinharze besteht darin, daß sie von allen gelösten Substanzen sehr leicht abzutrennen sind.

Da, wie erwähnt, Trypsin von sämtlichen Proteaseninhibitoren gehemmt wird, eignet sich dieses Verfahren zur Isolierung aller Proteaseninhibitoren bis zu einer gewissen Molekülgröße. Zu große Inhibitormoleküle können aus sterischen Gründen keinen Komplex mit dem aktiven Zentrum des an das Trägerharz gebundenen Trypsins mehr eingehen.

Chemische Grundlage:

Das Trypsin wird bei diesem Verfahren kovalent über Aminogruppen an den wasserlöslichen Trägern gebunden. Das von uns verwendete Material wurde aus CM-Celulose-hydrazid (E. Merck, Darmstadt) und Trypsin nach einer Vorschrift der Fa. Merck dargestellt.



Bei der Bildung des Enzyminhibitor-Komplexes assoziiert sich ein größerer Bereich des Inhibitor-Moleküls mit dem Enzymmolekül (1, S. 35).

Bei der Inhibitorisolierung ist zu beachten:

- Die Bindung eines Inhibitors an das Trypsinharz ist abhängig von der Molekülgröße. Je größer die Moleküle eines Inhibitors sind, umso weniger werden aus

sterischen Gründen an dieselbe Menge Enzymharz gebunden.

- Für die Komplexbildung ist auch der Ladungscharakter der Kopolymermatrix entscheidend. Inhibitoren, die bei pH 7 - 8 positiv geladen sind, z.B. Trasylol, werden besser komplex gebunden als negativ geladene Inhibitoren.

Die abstoßenden Kräfte der Polyanionen überwiegen dabei die bei der Komplexbildung wirksamen anziehenden Kräfte.

g) Immunelektrophorese:

P r i n z i p:

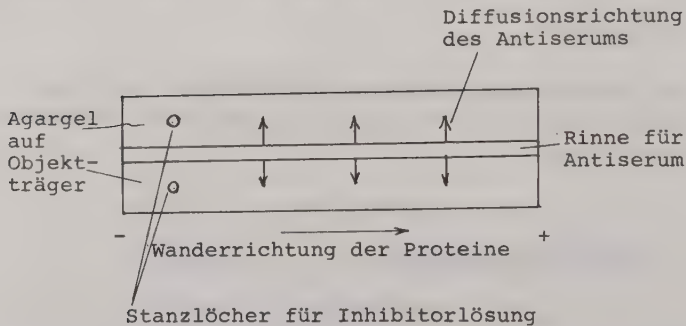
Jedes Protein hat aufgrund einer großen Zahl geladener Molekülabschnitte entweder eine positive oder negative Summe aller Ladungen.

Die Gesamtladung läßt ein Protein unter geeigneten Bedingungen in einem elektrischen Feld zu einer der beiden Elektroden wandern. Die Wanderrichtung ist von der Ladung des Proteins und vom pH des Elektrophorese-puffers abhängig.

Die Wanderungsgeschwindigkeit des Proteins ist eine Funktion der

- Größe des Moleküls,
- Größe der Ladung des Moleküls,
- Gestalt des Moleküls (Reibung)

So erreicht jedes Protein nach einer bestimmten Zeit auf dem Trägermaterial (hier Agargel) einen für dieses Protein charakteristischen Punkt.



Nach der elektrophoretischen Wanderung der Inhibitoren wird in die Rinne zwischen den beiden Agarhälften Antiserum eingebracht. Dieses diffundiert in das Agargel und ergibt mit den Inhibitorproteinen einen Niederschlag.

Reagenzien und Material:

- Lösung von 1,5 g Reinagar unter Erhitzen in 100 ml H_2O ,
- in 0,05 m Boratpuffer gelöstes, inhibitorhaltiges Lyophilisat Inter- α -trypsininhibitor⁺,
- Anti-inter- α -trypsininhibitor-serum vom Kaninchen⁺,
- Elektrophoresepuffer pH 8,2

⁺ stammt von Behringwerken/Marburg

Nach Michaelis: 19,42 g $\text{CH}_3\text{-COO Na}$ und 29,42 g Natrium-diäthylbarbiturat werden in 1 l Aqua dest. gelöst.

8 Teile HCl auf pH 8,2 einstellen.

1 Teil der Lösung und 2 Teile Aqua dest. ergibt eine Ionenstärke von 0,05.

Herstellung der Agarplättchen:

Die Agarlösung wird auf 55°C erhitzt.

Jeweils 3 ml der Agarlösung werden auf einen Objektträger aufgegeben. Nachdem das Trägermaterial erstarrt ist (~ 5 Minuten) werden die Rinnen und Löcher zur Aufnahme der Inhibitorlösungen und des Antiserums gestanzt.

Durchführung:

In die Substanzlöcher der Agarplatten wird mit der Mikropipette auf der einen Seite der Rinne die Lösung eines isolierten Inhibitors und auf der anderen Seite Inter- α -trypsininhibitorlösung eingebracht. So hat man auf demselben Objektträger den Vergleich zwischen den Wandereigenschaften bekannter und unbekannter Inhibitoren.

Das Protein in den Lösungen wird mit Bromphenolblau sichtbar gemacht.

Die Elektrophoresekammer wird mit konstanten 80 mA und 110 - 150 V Gleichspannung betrieben. Eine ausreichende Laufstrecke ist nach 220 Minuten zurückgelegt.

Dann werden die Rinnen der Objektträger mit Anti-inter- α -trypsininhibitorserum von Kaninchen gefüllt. Dieses diffundiert in das Agargel und ergibt dort mit den

Inhibitoren einen Niederschlag, der photographisch aufgezeichnet wird.

2. Arbeitsgänge zur Isolierung des Inhibitors

a) Gewinnung einer ungereinigten Lösung des Inhibitors:

- aus dem Enteiweißungsüberstand

5 Liter menschliches Citratplasma werden mit 2 Liter Wasser verdünnt und unter Rühren mit konzentrierter Perchlorsäure bis zu einer Endkonzentration von 3 % versetzt. Die ausgefällten höhermolekularen Proteine werden durch Zentrifugation entfernt, der Überstand wird unter Kühlung mit 4 n KOH auf pH 6,0 eingestellt. Mit dem Trypsintest wird sein Inhibitorgehalt geprüft. Daraufhin wird er im Rotationsverdampfer bei Unterdruck auf etwa 400 ml eingeengt. Durch diese erhebliche Konzentration fällt eine entsprechend große Menge KCl aus. Die verbleibende Lösung enthält dann etwa 60 mIU/ml (IU = inhibitor unit). Anschließend wird die Lösung mit Aqua bidestillata 1:1 verdünnt und in einer Druckdialysekammer mit der Membran Amicon UM 2 bei 5 Atm. N_2 Druck weiter eingeengt und partiell entsalzt. Dadurch wird eine Konzentrationserhöhung des Inhibitors um das 8 - 10fache erreicht. Der anschließende Trypsinhemmttest mit dem Dialysat gibt Aufschluß über eventuelle Inhibitoraktivitätsverluste durch die Dialyse.

Nach Einstellen des pH-Wertes auf 7,8 mit KOH wird bei 0 - 2° C durch Kühlung im Eiswasserbad soviel

Trypsincellulose eingerührt, bis in filtrierten Proben keine Hemmwirkung des Überstandes mehr festzustellen ist. Nur bei einem alkalischen pH wird der Inhibitor an die Trypsincellulose gebunden. Die Cellulose wird durch Zentrifugieren von der Lösung getrennt und mehrmals mit kaltem 0,2-molarem Triäthanolamin-HCl-Puffer von pH 7,8 gewaschen. Der Überstand wird verworfen. Die Cellulose wird dann in 0,3 m KCl bei 0° C suspendiert und der pH-Wert mit HCl auf 2,0 eingestellt. Bei diesem niedrigen pH wird der gebundene Inhibitor wieder freigegeben. Die Trypsincellulose wird daraufhin abzentrifugiert und die Hemmstoffe befinden sich im Überstand. Dieser wird auf pH 7,0 zurückgestellt, im Rotationsverdampfer bei Unterdruck eingengt und durch Druckdialyse partiell entsalzt.

- Gewinnung aus nativem Plasma

5 Liter menschliches Citratplasma werden mit 2 Liter 0,9-prozentiger NaCl-Lösung verdünnt, um die Isotonie zu bewahren, der pH-Wert wird mit NaOH auf 7,8 eingestellt. Als weiterer Schritt wird die gleiche Trypsincellulosemenge wie oben ermittelt, unter Kühlung im Eiswasserbad bei 0 - 2° C eingerührt. Wenn keine Hemmwirkung in einer filtrierten Probe mehr festzustellen ist, - dies ist etwa nach 10 Minuten der Fall - wird die Trypsincellulose durch Zentrifugieren vom Plasma abgetrennt und, wie oben beschrieben, weiterbehandelt.

b) Reinigung der Inhibitoren (für die beiden in a gewonnenen Produkte gleich)

Gelfiltration auf der Sephadex-G-75-Säule

Säulenfüllung Sephadex-G-75 (Hersteller: Pharmacia

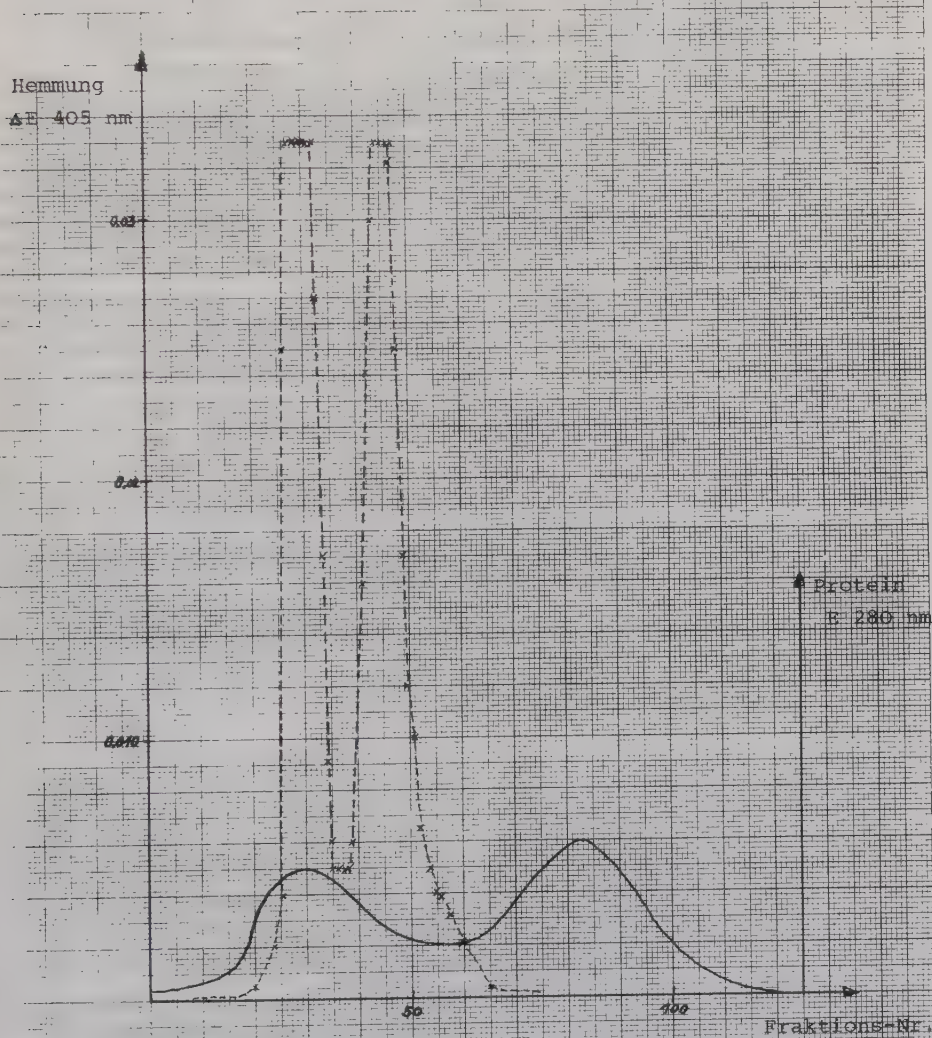
Uppsala), Säulenmaße 200 x 3,4 cm.

Sephadex wirkt als Molekularsieb: Die großen Moleküle werden schneller eluiert; je kleiner ein Molekül ist, desto länger verbleibt es auf der Säule, da es in den Maschen der Makromoleküle festgehalten wird. Elutionspuffer ist 0,05 molarer Boratpuffer pH 0,8 mit 0,2 m NaCl. Das Eluat wird in einem Fraktomat aufgefangan und im Uvicord mit selbsttätigem Schreiber durch Absorptionsspektrometrie bei einer Lichtwellenlänge von 280 nm laufend auf den Proteingehalt überprüft. Die Inhibitorlösungen werden nach Durchlaufen der Säule in Fraktionen von 9 ml aufgeteilt. Die Lokalisation der Hemmstoffe im Eluat erfolgt durch Bestimmung der Hemmwirkung aliquoter Teile auf die Hydrolyse von Na-Benzoyl-DL-arginin-4-nitroanilid durch Trypsin (Abb. 1). Die Ausführung erfolgt wie früher beschrieben. Die Hemmaktivität wird in zwei deutlich getrennten Gipfeln eluiert. Die den jeweiligen Komponenten zuzuordnenden Fraktionen werden vereinigt und über Druckdialyse weiter eingeeengt.

zu Abbildung 1:

Elutionsdiagramm der Inhibitoren aus dem Eiteiweißungsüberstand bei Filtration über Sephasex G-75 Säule: 3,4 x 200 cm, Fraktionen zu 9 ml ausgezogene Kurve = Protein, registriert bei 380 nm; gestrichelte Kurve = Hemmwirkung gegen Trypsin. Auf der Ordinate sind die Differenzen E_{405} der ungehemmten Standardreaktion ($0 = 0,033/\text{min}$) - E_{405} der gehemmten Reaktion (Bei 20 l eingesetztem Eluat) angegeben.

Abbildung 1:



Eichung der Säule und Bestimmung von Molekulargewichten:

Jede Säule hat ein bestimmtes Innenvolumen. Man kann es bestimmen durch das Aufbringen einer sehr hochmolekularen Substanz (z.B. γ -Globulin). Diese Substanz wird durch das Molekularsieb nicht retentiert. Die Gesamtmenge Eluat, die bis zum Erscheinen der hochmolekularen Substanz aus der Säule läuft, entspricht dem sog. Innenvolumen der Säule.

Zwei weitere Substanzen (Chymotrypsinogen u. Cytochrom c) mit bekanntem Molekulargewicht werden aufgegeben. Sie erscheinen - durch das Molekularsieb des Säuleninhaltes verschieden stark zurückgehalten - in immer derselben Fraktion des Eluates.

Die Anzahl von Mililitern Eluat bis zum Erscheinen derselben Substanz in der Eluationsflüssigkeit ist für ein und dieselbe Substanz konstant.

Eine Substanz mit unbekanntem Molgewicht wird nun nach einer von ihrer Molekülgröße abhängigen Anzahl Mililiter im Eluat nachweisbar sein.

Zur graphischen Bestimmung des unbekannten Molgewichtes sind folgende vier Werte notwendig:

Die Anzahl der Mililiter bis zum jeweiligen Auftauchen der drei Eichsubstanzen und der Substanz mit dem unbekannten Molgewicht in dem Eluat einer Säule. Zur Auswertung wird der Quotient aus dem Volumen vor dem Erscheinen des Chymotrypsinogens und des Cytochroms c einerseits und dem Innenvolumen andererseits ermittelt. In einem Koordinatensystem (y-Achse = Quotient; x-Achse = Molekulargewicht) werden beide Quotienten entsprechend

ihrem Molgewicht eingetragen. Die beiden Punkte, die man so erhält, werden durch eine Gerade miteinander verbunden.

Analog wird der Quotient für den Inhibitor errechnet und der Wert auf der Y-Achse desselben Koordinatensystems aufgetragen. Eine Parallele zur X-Achse durch diesen Punkt schneidet die oben gefundene Gerade. Eine Senkrechte auf der X-Achse durch diesen Schnittpunkt zeigt auf der Abszisse das unbekannte Molgewicht an. (siehe Abb. 2 und 3)

Biogel-P-2-Säule zur Entsalzung

Eine Glassäule mit den Maßen 3 x 50 cm wird mit Biogel P-2 gefüllt. Die in der Druckdialyse eingeeengten Fraktionen mit dem höchsten Inhibitorgehalt werden vorsichtig mit der Pipette auf die Säule aufgebracht und mit 0,1 M Ammoniumacetat als Elutionsmittel entsalzt.

Lyophilisation

Das entsalzte Eluat wird mit Trockeneis in einem Glaskolben eingefroren, das Lösungsmittel durch einen Vakuumverdampfer entfernt und eine Trockenmasse der festen Bestandteile der Lösung gewonnen. Die Trockenmasse wird im Trypsinhemmtest auf ihre Inhibitorhaltigkeit untersucht. Wir fanden nur einen geringen Inhibitorverlust von etwa 10 %.

Abbildung 2:

Eichkurve für Molegewichtbestimmung
mit Hilfe der Säulenchromatographie
über Glutonsorbitaring

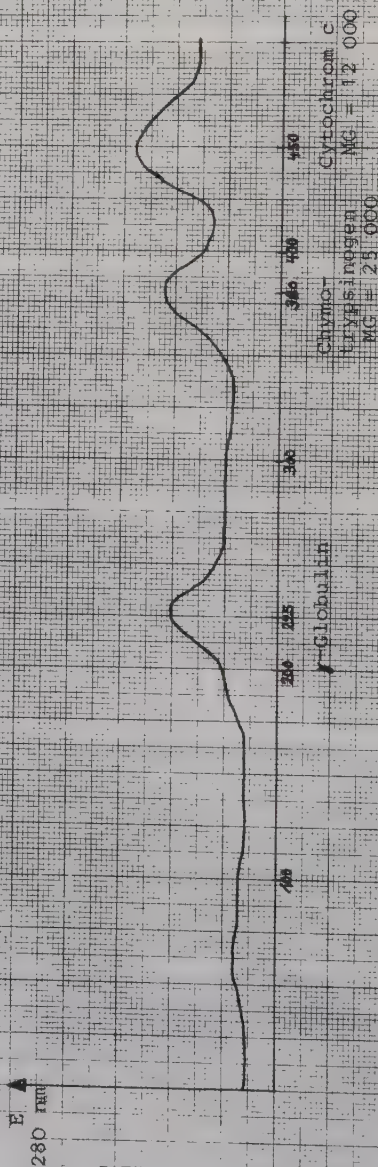
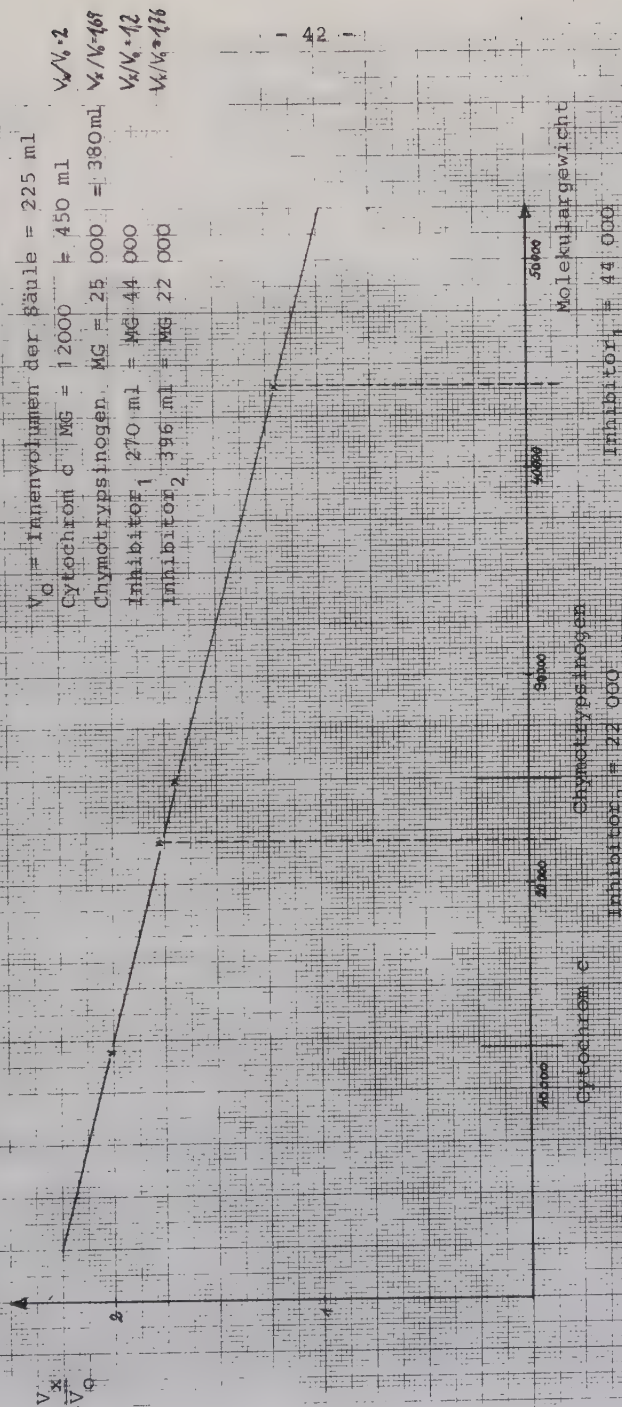


Abbildung 3: Graphische Ermittlung des Molekulargewichtes der Inhibitoren



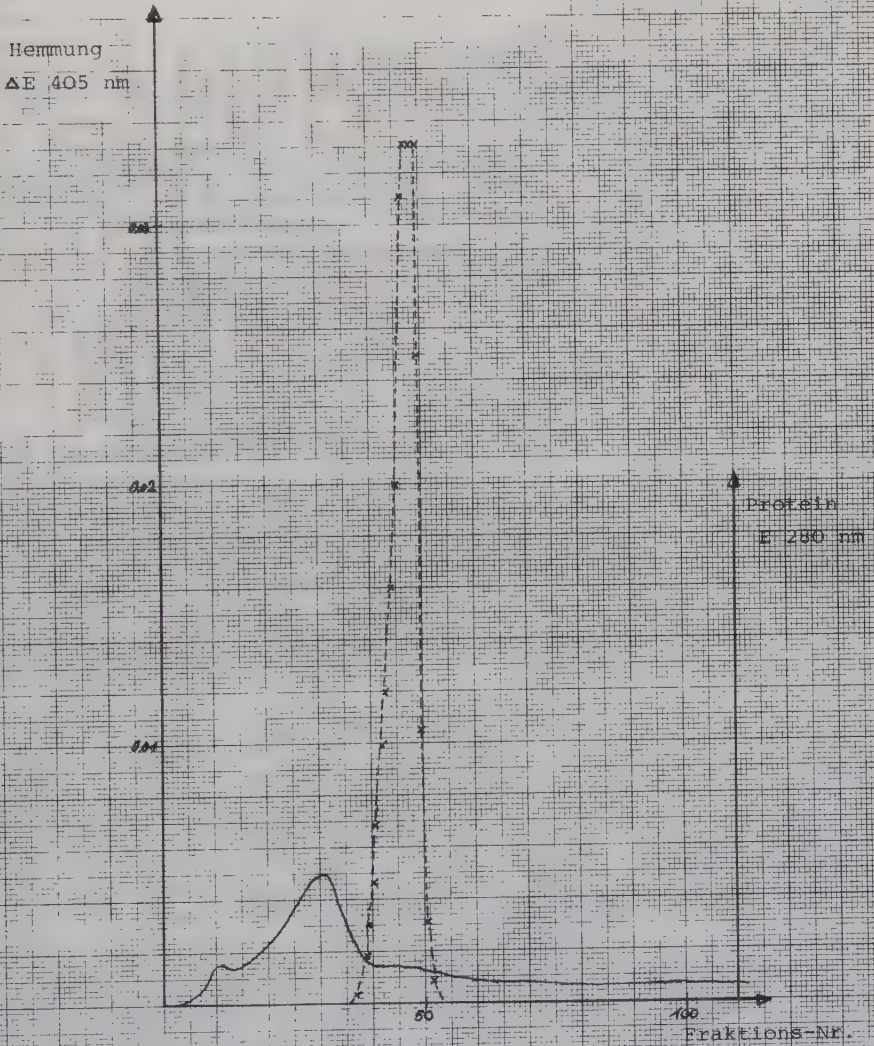
DEAE-Cellulose

Die Cellulose wird mit 0,2 M Boratpuffer von pH 7,8 äquilibriert und anschließend in eine Glassäule mit den Maßen 1 x 120 cm gefüllt. Das in Boratpuffer gelöste Lyophilisat, das neben niedermolekularen Inhibitoren noch viele höhermolekulare Begleitsubstanzen enthält, wird vorsichtig auf die Cellulose gegeben. Der Inhibitor wird an die Cellulose gebunden. Dann wird mit steigendem NaCl-Gradienten 0,5 molar bei 250 ml Borat-Startpuffer eluiert. Die vier verschiedenen Inhibitoren werden dabei - gereinigt von den Begleitsubstanzen - praktisch mit identischen Puffervolumina eluiert.

Die Lokalisierung und Isolierung in Substanz erfolgt wie unter der Gelfiltration angegeben. (Abb. 4)

zu Abbildung 4
Chromatographie des hochmolekularen Inhibitors aus Nativplasma an DEAE-Cellulose. Säule 1 x 120 cm, Fraktionen 9 ml, 0,02 M Boratpuffer pH 7,8, Gradient 0,5 M NaCl im gleichen Puffer, Startpuffermenge 250 ml.
Darstellung wie Abb. 1

Abbildung 4:



3. Charakterisierung der Inhibitoren

a) Hemmspektrum

Um einen Inhibitor klar charakterisieren zu können, benötigt man Hemmkurven gegen verschiedene Proteasen, z.B. Trypsin, Chymotrypsin, Plasmin, Kallikrein usw. Wir beschränkten uns zur allgemeinen Charakterisierung und zum Vergleich mit dem Bronchialsekretinhibitor auf die Wirkung gegenüber Trypsin und Chymotrypsin. (Abb. 5 und 6)

b) Immunelektrophorese

Nach simultaner Elektrophorese der Inhibitoren, die wir in den beschriebenen Arbeitsgängen isoliert haben, und von Inter- α -trypsininhibitor⁺ in Agargel, lassen wir, wie im experimentellen Teil beschrieben (1. g), das Antiserum gegen das Antigen diffundieren. Als Antiserum verwendeten wir Anti-inter- α -trypsininhibitorserum vom Kaninchen, hergestellt bei Behring/Marburg.

⁺ Geschenk der Behringwerke/Marburg

Abbildung 5:

Trypsinhemmkurven

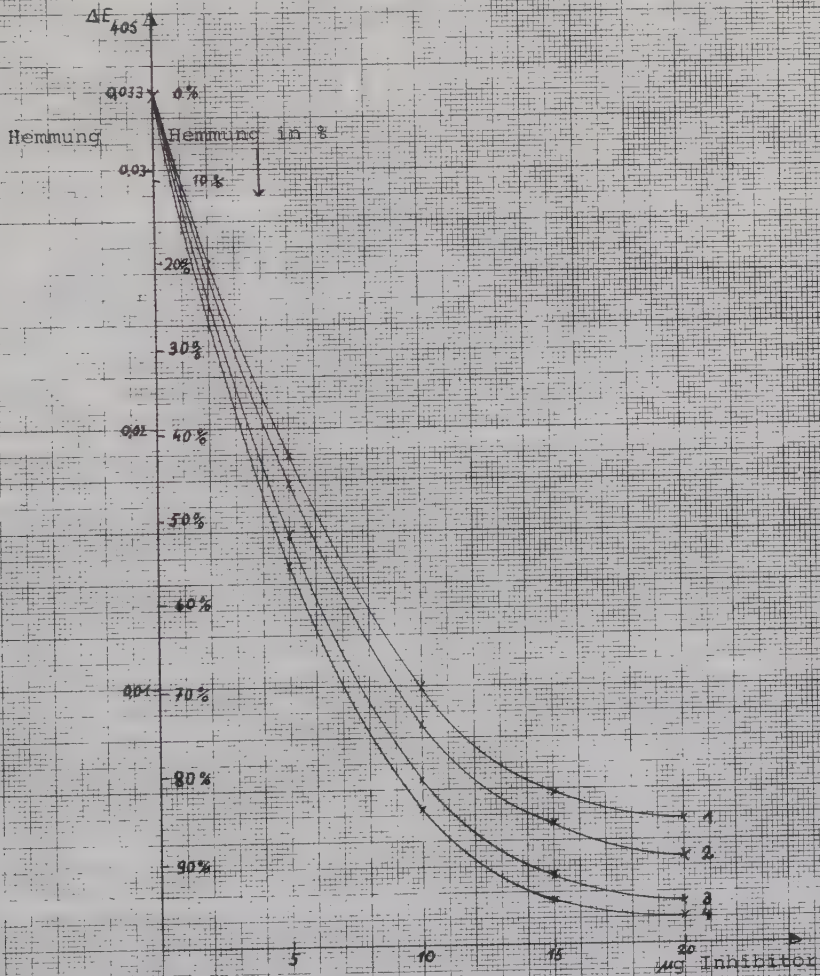
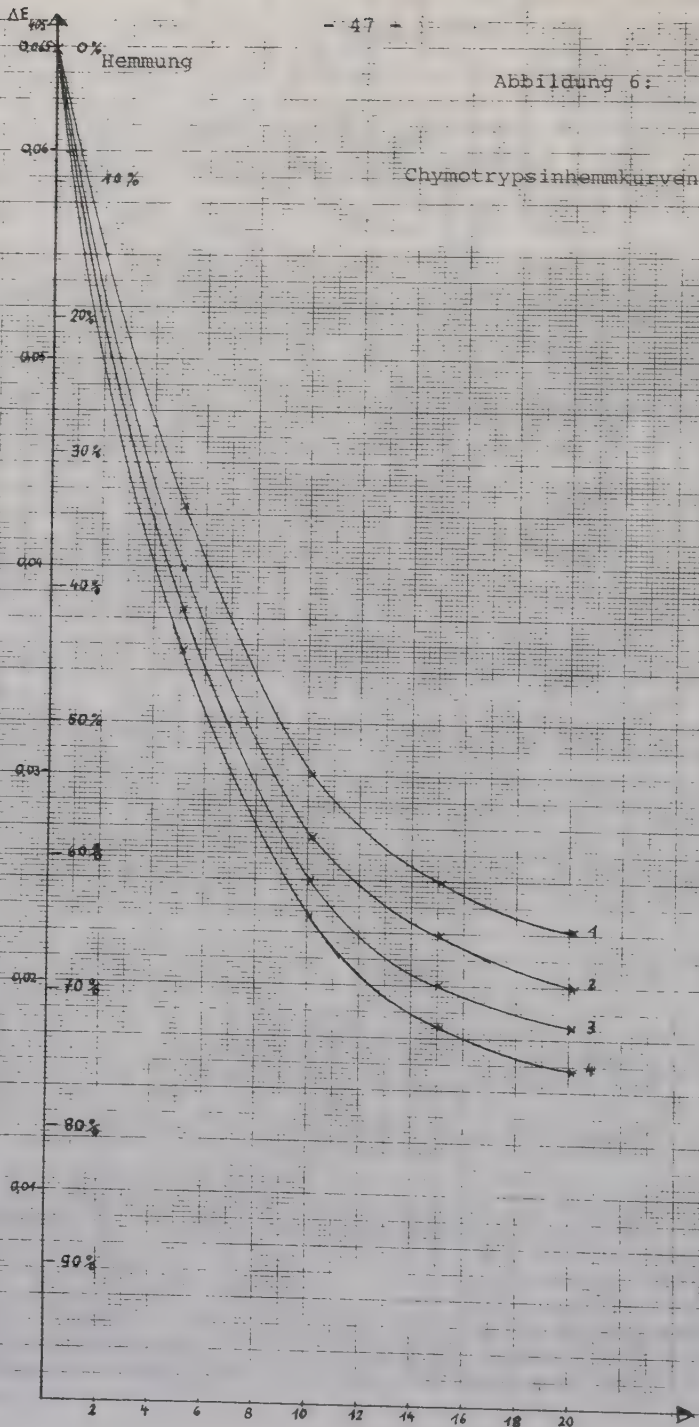


Abbildung 6:



zu Abbildung 5:

Titration von Trypsin mit den verschiedenen Inhibitoren

Ansätze: Trypsin 10 mU, Endvolumen (Inhibitorlösung und Puffer) 2 ml. 1 ml N - Benzoyl-DL-Arginin -4-nitroanilid, Endkonzentration 73 $\mu\text{mol/l}$. E_{405} der ungehemmten Reaktion = 0,033/min. bei 25° C.

Abszisse: Menge des eingesetzten Inhibitors

Ordinate: Enzymaktivität bzw. Hemmung in %
zum inhibitorfreien Reaktionsansatz.

zu Abbildung 6:

Titration von Chymotrypsin mit den verschiedenen Inhibitoren.

Ansätze: Chymotrypsin 20 mU, Endvolumen (Inhibitorlösung und Puffer) 2 ml. 1 ml Succinyl-L-phenylalanin-4-nitroanilid, Endkonzentration 0,43 mmol/l. E_{405} der ungehemmten Reaktion 0,065/30 min bei 25° C.

Abszisse und Ordinate wie in Abb. 5

Für beide Kurven gilt:

1 = Inhibitor aus	Nativplasma	MG = 44 000
2 = "	"	Enteweißungsüberstand MG = 44 000
3 = "	"	Nativplasma MG = 22 000
4 = "	"	Enteweißungsüberstand MG = 22 000

Immunelektrophorese

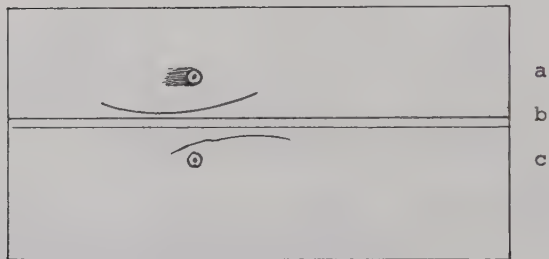


Abbildung 7:

Immunelektrophorese von 20 μg Inhibitor aus Nativplasma ($\text{MG} = 44\,000$) (a) und 15 μg Inter- α -trypsininhibitor (c). b = Anti-inter- α -trypsininhibitorserum vom Kaninchen. Die übrigen Inhibitoren ergeben ähnliche Bilder.

c) Molgewichtsbestimmung (1, S. 88)

Das Molgewicht der Inhibitoren wird näherungsweise durch Gelfiltration an Sephadex G-75 ermittelt (Säulen 1 x 200 cm, Boratpuffer pH 7,0, 0,1 n NaCl). Dazu ist es notwendig mit Proteinen von bekanntem Molgewicht eine Beziehung zwischen Elutionsvolumen und Molgewicht der einzelnen Eiweißkörper herzustellen. Aus den Elutionsvolumina der Substanzen mit unbekanntem Molgewicht kann durch Interpolation auf das Molgewicht geschlossen werden. (Abb. 2 und 3)

d) Endgruppenbestimmung

Zur Identifizierung der N-terminalen Aminosäuren dient die Reaktion mit Dinitrofluorbenzol nach Sanger. Die hierdurch eingeführte Maskierungsgruppe - der Dinitrophenylrest - bleibt bei der Hydrolyse des Peptids erhalten. Neben den freien Aminosäuren enthält das Hydrolysat eine Dinitrophenylaminosäure, die gelb gefärbt ist und leicht identifiziert werden kann. Die Identifizierung erfolgt mittels Dünnschichtchromatographie (62) durch Vergleich der R_f -Werte mit bekannten Substanzen, z.B. Bi-dinitrophenyllysin = 1. Relativer R_f -Wert bedeutet den Quotienten von Wanderweg der unbekannten Substanz/Wanderweg des Bi-DNP-Lysins. Als Laufmittel wurde eine Kombination von Chloroform/Benzylalkohol/Essigsäure im Verhältnis 7:3:0,3 verwendet. Je reiner die abgetrennte Inhibitorsubstanz ist, desto weniger verschiedene Endgruppen sind zu ermitteln. Im Idealfall nur eine einzige. (Siehe Abb. 8)

Dünnschichtchromatographie

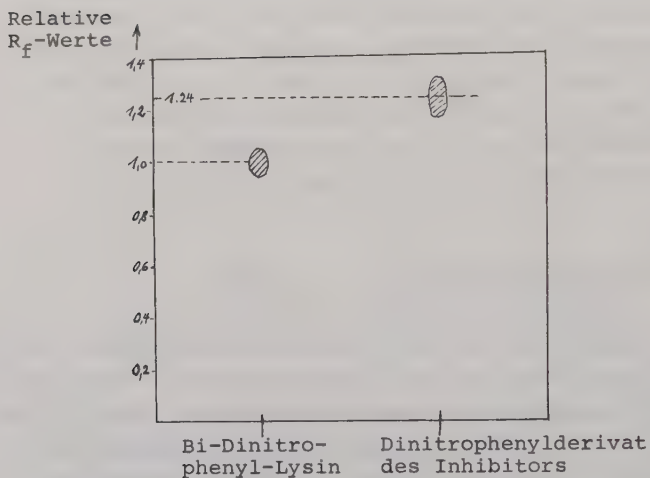


Abbildung 8:

Dünnschichtchromatogramm des Dinitrophenylderivates des Inhibitors mit Bi-dinitrophenyllysin als Vergleichssubstanz, deren relativer R_f -Wert = 1 gesetzt wurde. Als Laufmittel wurde ein Gemisch von Chloroform/Benzylalkohol/Essigsäure im Verhältnis 7:3:0,3 verwendet.

e) Aminosäurezusammensetzung

Es erfolgt eine saure Hydrolyse der Inhibitoren und zwar 24, 48 und 72 Stunden. Die Prozentuale AS-Zusammensetzung der sauren Hydrolysate wird im automatisch arbeitenden Beckman-Aminosäureanalysator ermittelt. Aus den Resultaten der Molgewichtsbestimmung und der Aminosäureanalysen wird die Zusammensetzung der einzelnen Inhibitoren bestimmt. Der polymere Charakter der Inhibitoren wird damit nicht erfaßt. Der Polymerisationsgrad kann jedoch aus den spezifischen Hemmkapazitäten und aus dem Molgewicht der Trypsininhibitor Komplexe abgeschätzt werden.

$$\text{Hemmkapazität} = \frac{\text{Molgew. Trypsin}}{\text{Molgew. Inhibitor}}$$

f) Charakterisierung des aktiven Zentrums

Es gibt zwei Gruppen von säurestabilen, niedermolekularen Proteaseninhibitoren und zwar Lysin- und Arginininhibitoren, je nach der am aktiven Zentrum beteiligten Aminosäure. Zur Charakterisierung wurde der von uns isolierte Inhibitor mit Maleinsäureanhydrid umgesetzt. Ein Lysininhibitor wird hierbei an den α - und ϵ -Aminogruppen acyliert und verliert seine Aktivität. Anders beim Arginininhibitor, dessen Aktivität dadurch nicht vermindert wird; dies geschieht erst bei Behandlung mit Butadion-2,3. (1, S. 37)

g) Spezifische Aktivität der Inhibitoren

Die Definition ist analog der spezifischen Aktivität der Enzyme : $A_I = \frac{\text{mIU}}{\text{mg Protein}}$. Die Voraussetzung zur Bestimmung der spezifischen Aktivität der isolierten Inhibitoren ist die Hemmwirkung des Inhibitors - gemessen im Trypsintest - pro mg Protein, das in der im Test eingesetzten Lösung enthalten ist. Der Proteingehalt wird nach der Biuretmethode bestimmt.

(62, S. 152)

V. Diskussion

Wie bereits erwähnt, wurden von Hochstraßer und Mitarbeitern aus den Sekreten der oberen Luftwege neben dem α_1 -Antitrypsin 2 niedermolekulare Proteaseninhibitoren isoliert (55, 56, 63, 64) und auf ihre Funktion vor allem in Bezug auf die Hemmung der Leukozytenproteasen hin untersucht. (57, 65, 66, 67). Beide weisen eine Antigenverwandtschaft mit dem Inter- α -trypsininhibitor auf. Um den funktionellen Zusammenhang zwischen Inter- α -trypsininhibitor und niedermolekularem Sekretinhibitor näher zu ergründen, war es notwendig, die Eigenschaften des niedermolekularen, säurestabilen Serum-inhibitors mit dem Inter- α -inhibitor und mit dem Bronchialsekretinhibitor zu vergleichen.

Um von vornherein einen Artefakt durch Säurebehandlung auszuschließen, wurde der Inhibitor sowohl aus denaturiertem wie auch aus nativem Plasma isoliert. Beide Male erhielten wir einen relativ niedermolekularen Proteaseninhibitor, der dimerisieren kann. Auch sämtliche sonstigen Eigenschaften wie Molekulargewicht, Antigen-determination, Hemmcharakteristiken, Aminosäurezusammensetzung sind identisch. Verglichen mit dem Inter- α -trypsininhibitor (= I α I) hat der niedermolekulare Serum-inhibitor die gleichen Antigen-determinanten wie dieser. Da der I α I eine sehr labile Substanz ist und spontan in mehrere Folgeprodukte zerfällt, könnte auch unser Inhibitor eines davon sein. Diese Folgeprodukte reagieren noch mit dem monovalenten Antiserum gegen I α I; die Lage der entsprechenden Präzipitate in der Immunelektrophorese unterscheidet sich jedoch deutlich von der der von uns isolierten Inhibitoren. Es ist jedoch hieraus klar ersichtlich, daß

die säurestabilen Hemmstoffe des Serums in engster Beziehung zum I α I stehen, zumal auch die reaktiven Zentren ähnlich gebaut sind. Wie die Acylierungsversuche belegen, gehören beide zur Gruppe der Arginininhibitoren (Proceedings 38, S. 17; 63). In gleicher Weise haben die hier isolierten Inhibitoren die speziellen Antigeneigenschaften und das reaktive Zentrum mit den Inhibitoren der Sekrete der oberen Luftwege gemeinsam. Auch ein Vergleich der Titrationskurven gegen Trypsin und Chymotrypsin zwischen Sekret- und Serum-inhibitor ergibt eine sehr weitgehende Übereinstimmung. Beide Gruppen von Inhibitoren sind jedoch nicht identisch, wie die Molekulargewichte - 15 000 bzw. 20 000 bei den Bronchialsekretinhibitoren und 22 000 beim Serum-inhibitor - und die Aminosäurezusammensetzungen zeigen (55, 56).

Als Schlußfolgerung daraus ergibt sich, daß es sich bei den Sekretinhibitoren somit keineswegs um einfach sezernierte säurestabile Inhibitoren des Serums handelt. Es müßte in diesem Falle zumindest angenommen werden, daß durch aktive Prozesse in den Schleimhäuten der Atemwege eine weitere Verkleinerung des Inhibitor-moleküls aus dem Serum erfolgt, wobei jedoch die Antigen-determinanten erhalten bleiben.

Eine andere Möglichkeit besteht darin, daß die Inhibitoren in der Schleimhaut selbst produziert werden und im I α I nur die Transportform im Serum von rückresorbiertem Sekretinhibitor gesehen werden muß.

Für eine mögliche therapeutische Anwendung ist die Kenntnis des Bildungsmechanismus des Inhibitors von

entscheidender Bedeutung, da einerseits eine systemische, andererseits wohl nur lokale Anwendung in Frage käme. Es muß noch Gegenstand weiterer Untersuchungen sein, diesen komplexen Sachverhalt Schritt für Schritt deutlicher zu machen.

VI. Zusammenfassung

Bei der Untersuchung der säurestabilen Proteaseninhibitoren aus Humanplasma ergab sich folgendes:

1. Aus dem Überstand von enteiweißtem Humanplasma und aus nativem Humanplasma wurden durch reversible Bindung an Trypsinzellulose jeweils 2 säurestabile Proteaseninhibitoren mit Molekulargewichten von 44 000 und 22 000 isoliert.
2. Alle 4 isolierten Inhibitoren zeigen gleiches Hemmverhalten gegenüber Trypsin und Chymotrypsin. Sie sind sämtlich Arginininhibitoren und liefern nach Dinitrophenylierung das gleiche Dinitrophenylderivat unbekannter Zusammensetzung.
3. Die gefundene spezifische Aktivität wie auch die Aminosäurezusammensetzung aller 4 Inhibitoren ist sehr ähnlich, so daß der höhermolekulare Inhibitor als ein Dimeres des niedermolekularen angenommen werden kann.
4. Die Inhibitoren zeigen Antigenverwandtschaft mit dem säurelabilen Inter- α -trypsininhibitor des Plasmas, ebenso wie der niedermolekulare Bronchialsekretinhibitor, von dem sie jedoch die Aminosäurezusammensetzung und das Molekulargewicht unterscheiden.

Literaturverzeichnis

1. Hochstraßer K., Habilitationsschrift Med. Fak.
Univ. München 1969
2. Weinland E., Z. Biol., 44.1 (1903)
3. Kraut H., E. K. Frey, E. Werle, Z. Physiol. Chem.,
192, 1 (1930)
4. Ham W.E., Sandstedt R. M., J. biol. Chem., 154,
505 (1944)
5. Kunitz M., Science 101, 668 (1945)
6. Werle E., L. Maier, F. Löffler, Biochem. Z. 321,
372 (1951)
7. Belolhwak L., Ber. Getreidechemikertagung,
Detmold 1964, S. 19
8. Shyamala G., R. L. Lyman, Canac. J. Biochem.,
42, 1825 (1964)
9. Laskowski M., in: S. P. Colowick, V. O. Kaplan,
Methods of Enzymology, II, 36, (1955)
10. Peanasky R. J., Fed. Proc. 22, 246 (1963)
11. Werle E., L. Maier, E. Ringelmann, Naturwissen-
schaften, 39, 328 (1952)
12. Laskowski M., M. Laskowski jr., in: M. L. Anson,
k. Baily, J. T. Edsall, Advances in
Protein Chemistry IX, 203 (1954)
13. Desmelle P., in: P. D. Boyer, H. Lardy, K. Myr-
bäck, The Enzymes, Bd. IV (1960), S. 128
14. Laskowski M. jr., M. Laskowski, J. biol. Chem.
190, 563 (1951)

15. Astrup T., J. Sterndorff, Scand. J. clinic. Lab. Invest., 7, 239 (1955)
16. Jacobson K., Scand. J. clin. Lab. Invest., 7, 57 Suppl. 14 (1955)
17. Schulze E. E., J. Göllner, K. Heide, M. Schönb-berger, G. Schwick, Z. Naturforschung 10 b, 463, (1955)
18. Mansfeld V., M. Rybak, Z. Horakova, J. Hladovec, Z. physiol. Chem. 318, 6 (1960)
19. Moll F. C., S. F. Sunden, J. R. Brown, J. biol. Chem. 233, 121 (1958)
20. Kunitz M., J. Northop, J. gen. Physil. 19, 991 (1936)
21. Astup R., Acta physiol, Scand., 26, 243 (1952)
22. Haendle H., Dissertation Med. Fak. Univ. München 1966
23. Laskowski M., F. C. Wu, J. biol. Chem., 82, 18 204, 797 (1953)
24. Fritz H., Habilitationsschrift Med. Fak. Univ. München 1968
25. Mansfeld V., A. Ziegelhöffer, Z. Horakova, J. Hladovec Naturwissenschaften 46, 172 (1959)
26. Hochstraßer K., H. Feuth, E. Werle, Z. Physiol. Chem. Bd. 353. 855 - 860 (1972)
27. Schneider L., J. Szathmary, Z. Immunitätsforschung 98, 24 (1940)
28. Tsitouris G., S. Bellet, R. Eilberg, L. Feinberg, H. Sandberg, Arch. intern. Med., 108, 208 (1961)

29. Nilsson J. M., S. E. Bjorkman, L. Anderson,
Acta med. scand., 170, 87 (1961)
30. Paraskevas M., J. M. Nielsson, G. Martinson, Scand.
J. clin. Lab. Invest., 14, 138 (1962)
31. Corell J. T., A. Sjoerdsma, Proc. Soc. exp. Biol.
Med., 111, 274 (1962)
32. Laurell C. B., S. Eriksson, Clin. Chem. Acta,
11, 395 (1965)
33. Erikson S., Acta med. scand., 177, Suppl. 432 (1965)
34. Vogel R., J. Trautschold, E. Werle, Natürliche
Proteinaseinhibitoren, G. Thieme-Verlag,
1966
35. Werle E., J. Trautschold, H. Sebening, H. Fritz,
H. Hutzler, Verh. Dtsch. Ges. Inn. Med.
S. 801, 70. Kongr., 1964
36. Fritz H., J. Trautschold, G. Hartwich, E. Werle
Fed. Europ. Biochem. Soc. II. Meeting,
Wien 1965
37. Allison A., Sci. Americ. 5, 242 (1967)
38. Heimbürger N., H. Haupt, H. G. Schwick Prot. Inh.
of human Plasma in Proceed. of int. Res.
Conf. on Prot. Inhib., Munich 1970
39. Forell M. M., Gastroenterologia (Basel) 84, 225
(1955)
40. Walford R. L., B. Kickhöfen, Arch. Biochem., 98,
191 (1962)
41. Meyer A., Habilitationsschr. Med. Fak. Univ.
Münch. 1964

42. Meyer A., E. Werle, in: Henning N., K. Heinkel,
H. Schön Pathogenese, Diagnostik, Klinik
und Therapie des exokr. Pankreas Schattauer
Verl. 1964
43. Marx R., Klin. Demonstat. d. I. Med. Univ. Klinik
München, Nov. 1960
44. Steichele D. F., M. J. Herschlein, Med. Welt
1961, 1855
45. Marx R., Hamburger Symposium über Blutgerinnung
1962
46. Werle E., J. Trautschold, München. Med. Wschr. 103,
713 (1961)
47. Forell M. M., Pharmakotherapie 1 79 (1963)
48. Henning N., K. Heinkel, H. Schön, Pathogenese,
Diagnostik, Klinik und Therapie der Er-
krankungen des Exokrinen Pankreas
Schattauer Verl. 1964
49. Schön H., B. Rässler, J. Alter, Clin. Chem. Acta
7, 571 (1962)
50. Hartley F. K., F. R. Jevons, Biochem. J., 82, 18
(1962)
51. Beuchelt H., Med. Chem. Z. 763 (1963)
52. Hochstraßer K., H. Haendle, R. Reichert, E. Werle
Z. Physiol. Chem. 352, 954 (1971)
53. Hochstraßer K., Ärztl. Praxis, XXV Jg., Nr. 36
1973, S. 1749
54. Hochstraßer K., E. Werle, R. Reichert, Z. Physiol-
Chem. 353, S. 221 - 226, 1972
55. Hochstraßer K., Reichert R., Schwarz S., Werle E.,
Z. Physiol. Chem. 355, 221 - 226 (1972)

56. Hochstraßer K., Reichert R., Schwarz S., Werle E.,
Z. Physiol. Chem. 354, 923 - 926 (1973)
57. Reichert R., K. Hochstraßer, G. Conradi Pneumono-
logie 147, 13 - 20 (1972)
58. Reichert R., K. Hochstraßer, G. Fruhmann, H. Fritz,
E. Werle, Pneumonologie 147, 41 - 45 (1972)
59. Recommendations 1964 of the international Union of
Biochemistry "Enzym Nomenclature"
Elsevier Amsterdam 1965
60. Trautschold J., Habil.schr. Med. Fak. Univ. Münch.
1965
61. Katchalski E. et al., Biochemistry 3, 1905 (1964)
62. Siegmund P., E. Schütte, F. Körber Praktikum der
Physiol. Chemie W. De Gruyter 1968,
S. 197 - 201
63. Hochstraßer K., Reichert R., Heimbürger N.,
Z. Physiol. Chem. 354, 587 - 588, (1973)
64. Reichert R., K. Hochstraßer, E. Werle Z. Laryng.
Rhinol. 51, 190 - 193, (1972)
65. Reichert R., K. Hochstraßer Archiv klin. exp.
Ohren-, Nasen- u. Kehlkopfheilk., Bd. 202,
Heft 2, 1972, S. 377
66. Reichert R., K. Hochstraßer Z. Laryng. Rhinol. 51
73 - 80 (1972)
67. Reichert R., K. Hochstraßer, M. Eisenmann Arch.
klin. exp. Ohr-, Nasen u. Kehlk. Heilk.
203, 109 - 114 (1972)

Meinem verehrten Doktorvater, Herrn Professor Dr. K. Hochstraßer, danke ich an dieser Stelle für die großzügige Förderung und die jederzeit freundliche und bereitwillige Unterstützung, die er mir bei meiner Arbeit zugute kommen ließ.

Herrn Professor Dr. H. H. Naumann, dem Direktor der HNO-Klinik, danke ich für den Arbeitsplatz und die guten Arbeitsbedingungen, die mir diese Arbeit ermöglichten.

Weiterhin danke ich Herrn Dr. H. Feuth, Frau S. Heindl und Frä. K. Lempart für ihre Unterstützung.

L e b e n s l a u f

Geboren am 18. 12. 1947 in Traunstein als Sohn des
Diplomingenieurs Franz Steiner und seiner Ehefrau
Maria, geb. Schmid.

1954 - 58 Besuch der Volksschule in Übersee/Chiemsee

1958 - 67 Besuch des Humanistischen Gymnasiums in
Traunstein mit Abitur als Abschluß

1968 - 74 Medizinstudium an der Universität München

7. 8. 74 - 30. 4. 75 Medizinalassistent in Chirurgie
an der Chirurgischen Klinik Bogenhausen

1. 5. 75 - 31. 10. 75 Medizinalassistent in Innerer
Medizin am Krankenhaus München Schwabing
bei Herrn Professor Mehnert und bei Herrn
Professor König.

Seit 1. 5. 76 Assistent an der Inneren Abteilung
des Krankenhauses Landsberg/Lech.

München, den 20. 6. 76

